

氏 名 きむ じひょん 金 志洙

学 位 の 種 類 博士（薬学）

学 位 記 番 号 富医薬博甲第 151 号

学位授与年月日 平成 26 年 9 月 26 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教 育 部 名 富山大学大学院医学薬学教育部 薬学領域 博士課程  
生命薬科学専攻

学 位 論 文 題 目 Pathophysiological role of neuro-immune interaction between  
CGRP-containing enteric sensory neurons and mucosal mast  
cells in the development of food allergy and search for  
therapeutic agents against food allergy from Pakistani  
medicinal plants  
(食物アレルギーの病態形成における CGRP 含有腸管知覚神経と  
粘膜型マスト細胞の神経－免疫クロストークの病態生理学的役割  
及びパキスタン薬用植物からの食物アレルギー治療薬の探索)

論 文 審 査 委 員

(主査) 教 授 門脇 真 (指導教員)

(副査) 教 授 濟木 育夫

(副査) 准教授 安東 嗣修

## 論文内容の要旨

Food allergy is a serious public health concern that is estimated to affect approximately 5% of children and 3 - 4% of adults in developed countries. The pathogenic mechanisms underlying food allergy are not fully understood despite the epidemic prevalence and its life-threatening potential, and there is neither a curative drug treatment nor an effective means of prevention. Therefore, a deeper understanding of the pathology of food allergy is needed.

Mast cells play a central role as effector and conductor cells in the development of various allergic diseases via the release of various inflammatory mediators, such as proteases, eicosanoids, biogenic amines, cytokines and chemokines. Mast cells are classified as mucosal mast cells or connective tissue mast cells. It is well known that mucosal mast cells are morphologically, biochemically and functionally distinct from connective tissue mast cells. Yamamoto et.al. have previously demonstrated that our murine food allergy model exhibits several features of type-1 hypersensitive allergic reactions, such as allergic diarrhea, antigen-specific IgE hyperproduction and mucosal mast cell hyperplasia after oral food antigen exposure, and this model has provided evidence that mucosal mast cells, but not connective tissue mast cells are primarily responsible for the pathology of the food allergy model<sup>1)</sup>.

### **1. CGRP, a neurotransmitter of enteric neurons, contributes to the development of food allergy due to the enhancement of mucosal mast cell degranulation<sup>2)</sup>**

Neuro-immune interaction in the gut is substantially involved in the maintenance of intestinal immune homeostasis and the pathology of intestinal immune diseases, but this interaction is not fully understood. Lee et.al. have previously demonstrated that mucosal mast cells and nerve fibers containing calcitonin gene-related peptide (CGRP), a neurotransmitter of intrinsic enteric sensory neurons, are markedly increased and exist in close proximity to each other in the colon of food allergy mice<sup>3)</sup>. This study investigated the effects of CGRP on mucosal mast cell activation. CGRP alone failed to cause degranulation of mucosal-type bone marrow-derived mast cells (mBMMCs), but CGRP significantly enhanced the degranulation of mBMMCs induced by the calcium ionophore A23187 in proportion to culture duration (6 - 72 hr) after CGRP stimulation (60 min) and in proportion to the duration of CGRP stimulation (2 - 60 min) followed by culture duration (72 hr). CGRP did not alter A23187-increased cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration in mBMMCs under these conditions but did augment microtubule reorganization in resting and A23187-activated

mBMMCs. Furthermore, a CGRP antagonist alleviated allergic symptoms in the food allergy model. Together, the data suggest that CGRP is greatly involved in IgE-independent release of various allergic and inflammatory mediators and thereby causes serious mastocytosis and allergic symptoms in the murine FA model.

## **2. Effect of Pakistani medicinal plants on IgE/antigen- and ionophore-induced mucosal mast cells degranulation<sup>4)</sup>**

Cumulative evidence has now demonstrated the stimulation of mucosal mast cells by both allergic and non-allergic triggers and their inhibition as a potential therapeutic target in many diseases like food allergy. Hence, we screened medicinal plants from Pakistan against antigen- and ionophore-induced degranulation of mucosal mast cells. Aqueous ethanol extracts were screened. IgE/antigen- and A23187-induced degranulation of mBMMCs were screening assays and  $\beta$ -hexosaminidase released from degranulated mBMMCs was measured. Real time-polymerase chain reaction was employed to examine the expression of TNF- $\alpha$  and IL-4 mRNA. Among the ten plants screened against IgE/antigen stimulated degranulation, *Alpinia galangal* (AG) demonstrated significant suppression of the degranulation both concentration of 32  $\mu$ g/ml and 100  $\mu$ g/ml. In A23187-induced degranulation, all plants showed significant inhibition at 100  $\mu$ g/ml except *Tamarix dioica*. AG exhibited significant suppression at 32  $\mu$ g/ml. In a concentration dependent assay, AG revealed significant suppression at 10  $\mu$ g/ml against A23187-stimulated degranulation. Acetoxychavicol acetate (ACA), major constituent of AG, demonstrated significant inhibition at 3.2  $\mu$ M in IgE/antigen-treated cells and at 10  $\mu$ M in A23187-treated cells. Furthermore, both AG and ACA suppressed the IgE/antigen- and A23187-enhanced mRNA expression of inflammatory cytokines, TNF- $\alpha$  and IL-4, in mBMMCs. Our findings revealed the suppressive effect of AG and ACA on degranulation of mBMMCs by allergic and non-allergic stimuli, which can be utilized for future drug development against food allergy.

## **Conclusion**

This study investigated the effects of CGRP on the activation of mucosal mast cells in vitro using mBMMCs and in vivo using the food allergy model to elucidate the pathophysiological contribution of neuro-immune interactions to the development of food allergy. The present studies suggest that the neuro-immune interaction between mucosal mast cells and enteric sensory neurons may contribute to the development of food allergy.

Meanwhile, we screened the medicinal plants for potential therapeutic agents against allergic diseases caused by pathological activation of MMCs.

Taken together, these novel findings inspire a new appreciation for the pathology of neuro-immune interactions in food allergy, and simultaneously provide useful information from

Pakistani medicinal plants for the development of therapeutic agents against allergic diseases.  
diseases caused by pathological activation of MMCs.

Taken together, these novel findings inspire a new appreciation for the pathology of neuro-immune interactions in food allergy, and simultaneously provide useful information from Pakistani medicinal plants for the development of therapeutic agents against allergic diseases.

## 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

腸管粘膜は常に外来抗原に曝露されているが、粘膜免疫系により病原菌などに対しては非自己と見做し自己防御の免疫応答を行い、同時に腸内常在菌や食物抗原に対してはこれを自己と見做して免疫寛容を誘起している。そのため、腸管の粘膜層には多様な免疫細胞が数多く分布している。また、腸管には交感及び副交感神経系と腸管神経系が分布し、消化・吸収・分泌・運動機能などが制御されている。これらの神経は、腸管の免疫細胞が多数分布している粘膜固有層や粘膜上皮層の真下まで神経線維を密に投射している。その中には、腸管環境の情報を収集し他の神経や細胞に伝達する外来性及び内在性の知覚神経の神経線維も数多く存在している。近年、神経伝達物質の受容体が免疫細胞にも発現し、その活性化により免疫細胞の機能が調節されていることが明らかになっている。さらに、サイトカインや免疫グロブリンなどの免疫系のシグナルにより神経の活性が制御されていることも報告されている。このように神経系と免疫系が共通のリガンドや受容体を発現していることが明らかになってきているが、その生理学・病態生理学的な役割については未だ不明な点が多い。

申請者の金志玄さんが生命薬科学特別研究を行った研究室では、これまでに、マウス食物アレルギーモデルにおいて粘膜型マスト細胞及びCGRP (calcitonin gene-related peptide) 陽性神経線維の発現が著しく増加し、形態学的に近接または接触していることを明らかにしている。

そこで申請者の金志玄さんは、腸管内在性CGRP陽性知覚神経と粘膜型マスト細胞のクロストークと食物アレルギーの病態形成の関連を検討し、さらに食物アレルギー治療薬の探索研究を行った

本研究の骨子および審査結果は次のとおりである。

1. 腸管内在性知覚神経の神経伝達物質である **CGRP** は粘膜型マスト細胞の脱顆粒を亢進して食物アレルギーの病態形成を促進する。

マウス大腿骨の骨髓造血幹細胞より、4種類のサイトカインを用いて粘膜型マスト細胞 (mBMMC) を誘導した。また、mBMMC には **CGRP** の特異的受容体サブユニット **RAMP1** が発現していることを免疫組織化学的に明らかにした。**CGRP** は、単独では mBMMC を脱顆粒させなかったが、カルシウム・イオノフォア **A23187** による脱顆粒を亢進した。

マスト細胞の脱顆粒反応は、カルシウム非依存的で微小管形成依存的な分泌顆粒の細胞膜への移行のステップと、カルシウム依存的な細胞膜と分泌顆粒膜の融合のステップで制御されていると考えられている。そこで、微小管形成阻

害剤であるコルヒチンを用いて mBMMC で検討したところ、粘膜型マスト細胞においても上記のステップが脱顆粒反応において重要であることを明らかにした。

また、CGRP は mBMMC の A23187 による脱顆粒において、細胞内カルシウム濃度に影響を与えなかった。これらの結果から、CGRP の mBMMC でのカルシウム非依存的微小管形成に対する作用を検討したところ、CGRP は定常状態での mBMMC の微小管形成及び A23187 による mBMMC の微小管形成のいずれも促進することを見出した。

さらに、マウス食物アレルギーモデルにおいて、CGRP 受容体拮抗薬 BIBN4096BS は、食物アレルギーの症状を強く抑制し、腸管内在性 CGRP 陽性知覚神経が食物アレルギーモデルにおいて、神経ペプチド CGRP の分泌し病態形成に密接に関与していることを見出した。

従って、腸管内在性 CGRP 陽性知覚神経と粘膜型マスト細胞との密接なクロストークが、食物アレルギーの病態形成に深く関与していることを明らかにした。

2. パキスタンで伝統的に消化管疾患の治療に用いられている薬用植物からの食物アレルギー治療薬の探索研究により、*Alpinia galangal* 及びその主要構成成分 *Acetoxychavicol acetate* に強い粘膜型マスト細胞の脱顆粒に対する抑制作用を見出した。

パキスタンで、伝統的に消化管疾患の治療に用いられている 10 種類の薬用植物の抽出物を用いて、IgE/抗原刺激及び A23187 刺激による mBMMC の脱顆粒に対する作用を検討したところ、*Alpinia galangal* の抽出物に両刺激に対する最も強い抑制作用を見出した。そこで、その主要構成成分 *Acetoxychavicol acetate* の作用を検討したところ、 $3.2\mu\text{M}$  より両刺激に対する濃度依存的な抑制作用を見出した。

さらに、*Alpinia galangal* 抽出物及び *Acetoxychavicol acetate* を用いて、両刺激による mBMMC での TNF- $\alpha$  及び IL-4 の遺伝子発現の上昇に対する作用を検討したところ、濃度依存的な抑制作用を見出した。

従って、*Acetoxychavicol acetate* は食物アレルギー治療薬のリード化合物の候補となりうる可能性を示唆した。

本研究により申請者は、腸管内在性 CGRP 陽性知覚神経と粘膜型マスト細胞との密接なクロストークが、食物アレルギーの病態形成に深く関与していることを明らかにし、さらに食物アレルギー治療薬のリード化合物の候補となりうる可能性を持

つ化合物を、パキスタンで伝統的に消化管疾患の治療に用いられている薬用植物から見出した。

主査および副査は、申請者である金志沄さんに面接試験を行うと共に、論文内容について審査を行い、博士（薬学）を授けるに値すると判定した